

ТЕСТ-СИСТЕМЫ «ИД-ЭНТЕР» И «АБ-ГРАМ (-)» ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И СПЕКТРА ИХ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ПРИ СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

ШИЛИН В.Е. *, ОКУЛИЧ В.К. **, БУЛАВКИН В.П. ***

УО «Витебский государственный ордена дружбы народов медицинский университет»,
кафедра клинической лабораторной диагностики, *
кафедра клинической микробиологии и иммунологии, **
кафедра хирургии ФПК и ПК***

Резюме. Одним из осложнений диабета является синдром диабетической стопы, представляющий собой патологическое состояние стоп, связанное с патологией периферических нервов, макро- и микроангиопатией, а так же изменением костей, кожи и мягких тканей стопы, приводящее к костно-деструктивным или гнойно-некротическим заболеваниям стоп и голени. В этиологической структуре возбудителей важное место занимают представители семейства *Enterobacteriaceae* и другие грамотрицательные микроорганизмы, которые чаще встречается в ассоциациях.

При помощи разработанных нами тест-систем «ИД-ЭНТ» и «АБ-ГРАМ(-)» определена видовая структура энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов как возбудителей гнойно-некротических поражений при синдроме диабетической стопы, определен спектр их резистентности к антибиотикам и разработаны схемы эмпирической антибиотикотерапии.

Ключевые слова: энтеробактерии, грамотрицательные микроорганизмы, тест-система, антимикробная терапия, сахарный диабет, диабетическая стопа.

Abstract. The so-called diabetic foot syndrome is one of diabetes complications; it is a kind of pathologic condition of feet associated with the pathology of peripheral nerves, macro- and microangiopathy, as well as with lesions of the bones, skin and soft tissues of the foot which result in bones destruction, or pyo-necrotic diseases of the feet and legs. The most important role in the etiological structure of this disease is played by the representatives of *Enterobacteriaceae* family and other gram-negative microorganisms, which more often occur in combinations.

We have determined the etiological structure of enterobacteria and other gram-negative microorganisms as causative agents of pyo-necrotic lesions in diabetic foot syndrome by means of test-systems «ID-ENT» and «AB-GRAM(-)» which were previously designed by our research group. We have also evaluated the spectrum of their antibiotic resistance and worked out the schemes of empirical antibacterial treatment for this kind of pathology.

По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время в мире насчитывается более 98 млн.

больных сахарным диабетом и наблюдается очевидная тенденция к повышению заболеваемости [12, 13].

Из осложнений диабета, наиболее часто приводящих к инвалидности и снижению качества жизни пациентов, является синдром «диабетической стопы», представляющий со-

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра клинической лабораторной диагностики, тел. 8 (0212) 42-53-31 – Шилин В.И.

бой патологическое состояние стоп при сахарном диабете, связанной с патологией периферических нервов, макро- и микроангиопатией, а также изменение костей, кожи и мягких тканей стопы, приводящее к костно-деструктивным или гнойно-некротическим заболеваниям стоп и голени [1].

Если инфекционный процесс в коже и мягких тканях возникает за счёт хронической патологии (сахарный диабет, заболевания периферических сосудов, хронический алкоголизм и др.) на фоне скомпрометированной резистентности, то в этиологической структуре возбудителей важное место занимают представители семейства *Enterobacteriaceae* и другие грамотрицательные микроорганизмы, которые чаще встречается в ассоциациях [5].

Лабораторная диагностика возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний и осложнений, определение резистентности выделенной микрофлоры к антимикробным препаратам для разработки схем рациональной антибиотикотерапии даст возможность оптимизировать результаты лечения больных и замедлить рост резистентности к антимикробным препаратам. Для решения этой задачи в настоящее время различные зарубежные фирмы производят большое количество тест-систем и оборудования для идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам. Обладая целым рядом положительных моментов, эта продукция, при использовании в отечественных бактериологических лабораториях, обретает и ряд недостатков. Тест-системы и дополнительные реагенты одного производителя не могут использоваться на оборудовании другого. В системах определения чувствительности к антибактериальным препаратам предлагаемая палитра антибиотиков зачастую не совпадает с антибиотиками, используемыми в лечебно-профилактических учреждениях Республики Беларусь. Немаловажным является и высокая стоимость этой продукции. Это ограничивает применение тест-систем и оборудования зарубежных производителей в отечественных бактериологических лабораториях [8, 10].

Произошедшие в последнее десятилетие изменения в таксономии и номенклатуре микроорганизмов, приведшие к резкому расширению идентифицируемых видов, определили необходимость автоматизации и совершенствования методов идентификации. В современных программах автоматизированного учета результатов используется нумерический подход, при котором сходство между двумя исследуемыми видами считается тем больше, чем больше отношение числа совпадающих признаков к числу всех учитываемых. Более прогрессивными представляются подходы на основе многомерной статистики, которая вместе с совокупностью признаков учитывает и их значимость [10].

Таким образом, важным и актуальным будет разработка и использование тест-систем и оборудования отечественного производства с программным обеспечением на основе многомерной статистики для идентификации грамотрицательных микроорганизмов и определения их чувствительности к антибиотикам.

Целью наших исследований является определение этиологической роли грамотрицательных микроорганизмов и определение спектра их резистентности к антибиотикам при синдроме диабетической стопы с последующей разработкой схемы эмпирической антибиотикотерапии.

Методы

Работа выполнена в рамках задания ГНТП «Разработать тест-системы для автоматической идентификации и определения чувствительности к антибактериальным препаратам наиболее значимых возбудителей хирургической инфекции», № Госрегистрации 20064365. В срок выполнения ГНТП 2006-2010 гг. в УЗ «Витебская областная клиническая больница» обследовано 170 больных сахарным диабетом с гнойно-некротическим поражением мягких тканей и гангреной нижних конечностей. Наибольшее количество заболевших было в возрасте от 50 до 70 лет, что не противоречит данными литературы [9]. Длительность заболевания сахарным диабетом были в пределах от 1 года до 26 лет. При

поступлении в клинику уровень глюкозы в крови 3,2-32,4 ммоль/л. У большинства больных имелась изолированная гангрена одного или нескольких пальцев стопы. Реже гнойный процесс поражал всю стопу и распространялся на голень.

Забор материала производили в первые дни после поступления больного в стационар до назначения антибактериальной терапии. Повторные бактериологические обследования проводили, как правило, каждые 5 - 10 дней пребывания больного в клинике. Кратность взятия материала составила от 1 до 6 раз. Раневое отделяемое забирали в соответствии с правилами взятия материала [3, 4].

Для обнаружения различных видов стрептококков использовали 5% кровяной Колумбия-агар, стафилококки выделяли на желточно-солевом агаре, для выделения грибов применяли среду Сабуро.

Идентификация аэробных, факультативно-анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов проводилась с помощью тест-систем на биохимическом анализаторе АТВ *Expression* фирмы «*bioMerieux*» [2, 6, 11].

Для выделения энтеробактерий использовали среду Эндо с генцианфиолетовым, псевдомонады выделяли на среде с N-цетилпиридиния хлоридом, посев на микробы группы протей производили по методу Шукевича [4, 6, 7]. Засеянные питательные среды инкубировали при 37°C в течение 24-48 часов, затем отбирали по 3-5 колоний каждого вида.

Идентификацию выделенных культур проводили на основании результатов изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств. С этой целью изучали морфологию клеток в мазках с окраской по Грамму, морфологию колоний на средах. С помощью разработанной нами тест-системы «ИД-ЭНТ» [10] определяли окислительную и ферментативную активность: способность утилизировать D-маннит, D-мальтозу, адонитол, паллатинозу, D-глюкозу, D-сахарозу, L-арабинозу, D-арабит, D-трегалозу, L-рамнозу, инозит, D-целлобиозу, сорбит, ксилозу, дульцит и L-арабит; наличие глюкозаминидазной, галактозидазной, глюкозидазной, уреазной, галактонидазной, орнитиндекарбоксилазной, ар-

гининдегидролазной, лизиндекарбоксилазной, липазной, активности, способность гидролизовать малонат натрия и вырабатывать индол.

Из чистой суточной микробной культуры, согласно инструкции к тест-системе, готовили гомогенную микробную взвесь на 0,85% растворе хлорида натрия оптической плотностью 0,5 *McFarland* (конечная концентрация бактерий составляет $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл) при помощи денситометра или путем сравнения со стандартом. Затем полученную суспензию вносили в лунки со средами (субстратами) тест-системы в объеме 150 мкл. Инкубировали при температуре $36 \pm 2^\circ\text{C}$ в аэробных условиях в термостате. Время инкубации 18-24 час. Минеральное масло (для создания анаэробных условий) и дополнительные реагенты вносили согласно инструкции к тест-системе. Учет осуществлялся в автоматическом режиме на фотометре Ф300, адаптированном для определения цвета пробы, с использованием программного обеспечения NewId.

Кроме того, идентификацию других микроорганизмов проводили при помощи коммерческих тест-системы фирмы «*bioMerieux*» (Франция).

Для определения чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к антибиотикам использовали разработанную нами тест-систему «АБ – ГРАМ (-)» [8], которая позволяет определить резистентность к 23 антибактериальным препаратам: ампициллину, амоксициллину + клавуланату, цефоперазону, цефалексину, цефотаксиму, цефепиму, цефтазидиму, имипенему, меропенему, азтреонаму, цефтриаксону, азитромицину, гентамицину, нетилмицину, амикацину, моксифлоксацину, норфлоксацину, офлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, ломефлоксацину, ко-тримоксазолу и диоксилину.

Из чистой суточной микробной культуры готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической петлей вносили одну или более колоний, выращенных в течение 18-24 ч при 37°C на мясопептонном агаре или селективной среде для грамотрицательных бактерий, например Эндо, в ампулу (фла-

кон) с 2 мл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9%. Оптическая плотность взвеси в ампуле после внесения микроорганизма должна была соответствовать 0,5 оптических единиц *McFarland*. Это достигалось путем измерения на денситометре или на спектрофотометре при длине волны 550 нм - 0,125 OD; или сравнения со стандартом оптической плотности 0,5 оптических единиц *McFarland*.

Переносили в ампулу с питательной АБ средой 5 мкл приготовленной взвеси бактерий и тщательно перемешивали. Вносили в каждую лунку планшета по 135 мкл питательной среды АБ с микроорганизмами (конечная концентрация бактерий $\approx 10^7$ КОЕ/мл). Планшет накрывали крышкой и инкубировали 18-24 ч при 35-37°C в термостате.

После инкубации производили визуальный или инструментальный учёт. При визуальном учёте при наличии роста в лунке, штамм считали резистентным, а при отсутствии роста – чувствительным к определённой антибиотике.

Инструментальный учёт производился с помощью многоканального фотометра Ф300 на длине волны 620 нм и компьютера с программным обеспечением «Microbi».

Кроме того, чувствительность других микроорганизмов к антибиотикам оценива-

лась с помощью тест-систем фирмы «bioMerieux» (Франция).

Результаты и обсуждение

От 170 больных с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей при синдроме диабетической стопы на фоне сахарного диабета 1 и 2 типов нами выделено 143 (44,27%) микроорганизма представителя рода *Staphylococcus*, 110 штаммов (34,06%) семейства *Enterobacteriaceae*, 51 штамм (15,79%) семейства *Pseudomonadaceae*, 9 штаммов (2,79%) представителей семейства *Streptococcaceae*, 7 штаммов НГОП (2,17%) и по одному изоляту *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* и *Vibrio alginolyticus* (0,31%). Отрицательные результаты первичных посевов получены при исследовании микрофлоры в 13 случаях. Спектр микробной флоры при синдроме диабетической стопы представлен на рисунке 1.

Среди всех выделенных нами микроорганизмов, энтеробактерии были идентифицированы как *Proteus mirabilis* - 34 штамма (10,52%), *Proteus vulgaris* - 20 (6,19%), *Escherichia coli* - 18 (5,57%), *Escherichia cloacae* - 12 (3,71%), *Klebsiella pneumoniae* - 9 (2,78%), *Morganella morganii* - 5 (1,54%), *Klebsiella oxytoca* - 4 (1,23%), *Serratia marcescens* и

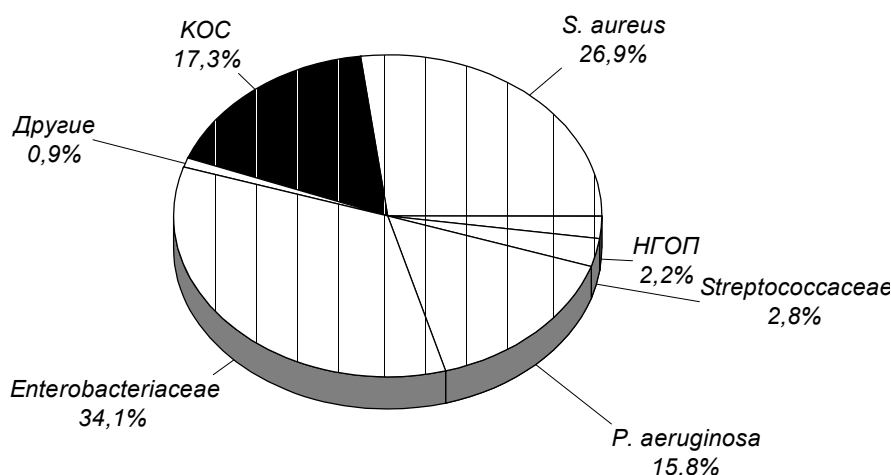


Рис. 1. Спектр микробной флоры у пациентов с синдромом диабетической стопы.

Citrobacter freundii – по 3 изолята (0,92%). *Serratia proteamaculans*, *E.aerogenes* – выделялись по 1 штамму (0,31%).

Из представителей семейства *Pseudomonadaceae* выделены *Pseudomonas aeruginosa* – 50 изолятов (15,47%) и *Pseudomonas putida* – 1 (0,31%).

Из НГОП выделены *Acinetobacter baumannii* – 5 изолятов (1,54%), *Aeromomas sobria* – 2 (0,62%).

В 40,87% случаев (132 штамма) выделялся только один вид бактерий, а в 59,13% (191 изолят) микробные ассоциации (табл. 1).

микроорганизмов (52,02%), которые могут выступать в качестве основных возбудителей.

Одно из ведущих мест в комплексном лечении гнойно-некротических заболеваний стоп и гангрены нижних конечностей у больных сахарным диабетом занимает выбор антибиотиков в комплексном лечении гнойно-некротических поражений.

В тест-системах «АБ-ГРАМ (-)» энтеробактерии показали наибольшую чувствительность к ципрофлоксацину и имипенему -85%, офлоксацину - 84%, азтреонаму - 82%, амикацину 81%, цефтазидиму и нетилмицину -75%.

Таблица 1

Ассоциации микробной флоры при синдроме диабетической стопы

Ассоциация	Количество
представитель семейства <i>Enterobacteriaceae</i> + <i>S.aureus</i>	23
представитель семейства <i>Enterobacteriaceae</i> + КОС	21
<i>P.aeruginosa</i> + <i>S.aureus</i>	10
<i>P.aeruginosa</i> + КОС	8
НГОП + <i>Staphylococcus spp.</i>	4
<i>P.aeruginosa</i> + <i>Proteus spp.</i>	4
<i>Staphylococcus spp.</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	3
<i>P.aeruginosa</i> + <i>S.aureus</i> + <i>Proteus spp.</i>	3
энтерококк или стрептококк + <i>Staphylococcus spp.</i>	3
представитель семейства <i>Enterobacteriaceae</i> + <i>E.cloacae</i> + <i>S.aureus</i>	3
<i>P.mirabilis</i> + <i>Serratia marcescens</i>	1
<i>E.coli</i> + <i>S.aureus</i> + <i>S.pyogenes</i>	1
<i>P.vulgaris</i> + <i>S.aureus</i> + <i>S.hominis</i>	1
<i>P.vulgaris</i> + <i>P.aeruginosa</i> + <i>S.epidermidis</i>	1
<i>E.coli</i> + <i>S.aureus</i> + <i>P.vulgaris</i>	1
<i>E.coli</i> + <i>S.simulans</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1
<i>Aeromomas sobria</i> + <i>S.lentus</i>	1
<i>E.cloacae</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1
Всего	90

Наиболее распространено у данной категории больных было сочетание стафилококка с представителем энтеробактерий (48,9%).

По данным наших исследований, инфекция при синдроме диабетической стопы характеризовалась значительным многообразием экзогенных возбудителей, из которых с высокой частотой встречались представители энтеробактерий и других грамотрицательных

Штаммы очень многих видов энтеробактерии были в 81% случаев резистентны к амоксициллину, который в макроорганизме метаболизируется до ампициллина, а к комбинации амоксициллина с клавулановой кислотой в 67% случаев. Внутри семейства энтеробактерий наблюдаются различия в спектре чувствительности к антибиотикам различных родов и видов. Представители рода *Proteus* более

чувствительны к ципрофлоксацину - 88%; азтреонаму - 84%; цефтазидиму - 81% штаммов; в 80% случаев к офлоксацину. Наблюдались существенные различия в спектре чувствительности индолположительных (*P. vulgaris*) и индолнегативных (*P. mirabilis*) штаммов протей к β -лактамным антибиотикам. Так, индолположительные штаммы были в 100% случаев резистентны к амоксициллину и его комбинации с клавулановой кислотой, в то время как только 27% индолотрицательных штаммов протей показали резистентность *in vitro*. Более низкую резистентность индолположительные, по сравнению с индолотрицательными штаммами показали для других антибиотиков соответственно: цефотаксим (31% и 9%), цефтазидим (29% и 9%), имипенем (43% и 9%), азтреонам (23% и 9%). Для аминогликозидов и фторхинолонов эти различия были не существенны. Все выделенные штаммы клебсиелл были в 100% случаев чувствительны к ими-

пенему и ципрофлоксацину, в 92% - к амикацину и ко-тримоксазолу, в 91% - к офлоксацину, в 83% - к нетилмицину, в 82% - к комбинации тикарциллин + клавулановая кислота и азтреонаму. Штаммы рода *Enterobacter* были очень высоко чувствительны (100%) к имипенему, амикацину, офлоксацину, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу. Несколько менее чувствительны (83% штаммов) к цефотаксиму, гентамицину, нетилмицину.

Псевдомонады проявляли очень высокую резистентность к антимикробным препаратам: только 60% штаммов была чувствительна к имипенему, 53% к амикацину. Чувствительность к другим препаратам, включая антипсевдомонадные пенициллины, была еще более низкой.

На основании полученных нами данных о спектре выделенной от больных чувствительности микрофлоры и клинической апробации разработана схема эмпирической терапии, которая представлена в таблице 2.

Таблица 2

Схема эмпирической терапии гнойно-некротических поражений мягких тканей и гангрены нижних конечностей у больных сахарным диабетом

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда
<i>Staphylococcus spp.</i>	ванкомицин цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин); цефотаксим;	фторхинолоны; карбапенемы
<i>Энтеробактерии</i>	цефотаксим	фторхинолоны; азтреонам; карбапенемы
<i>Псевдомонады</i>	амикацин	ципрофлоксацин; азтреонам; карбапенемы
<i>Стрептококки</i>	ампициллин; цефалотин	ванкомицин; цефуроксим; пенициллин
Смешанная флора: энтеробактерии в ассоциации со стафилококками	фторхинолон + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин)	цефотаксим или ванкомицин + азтреонам; карбапенемы
Состав микрофлоры не известен	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин)	фторхинолон + цефазолин или цефалотин; цефотаксим или ванкомицин + азтреонам; карбапенемы
Имеются клинические признаки анаэробной инфекции	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол	фторхинолон + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол

Заключение

По данным наших исследований, инфекция при синдроме диабетической стопы характеризуется значительным многообразием экзогенных возбудителей, из которых с высокой частотой встречаются представители энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов (52,02%), которые могут выступать в качестве основных возбудителей или в ассоциации.

При помощи разработанной нами тест-системы «ИД-ЭНТ» определена современная этиологическая структура энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов. В то же время, с использованием разработанной нами тест-системы «АБ-ГРАМ(-)» определен спектр их резистентности к антибиотикам, наиболее часто использующимся в лечебных учреждениях Республики Беларусь. Знание современной этиологической структуры при синдроме диабетической стопы и спектра резистентности к антибиотикам позволило создать протокол эмпирической терапии гнойно-некротических поражений мягких тканей и гангрены нижних конечностей у больных сахарным диабетом для УЗ «Витебская областная клиническая больница».

Литература

1. Газетов, Б.М. Хирургические заболевания у больных сахарным диабетом / Б.М. Газетов, А.П. Калинин. – М.: Медицина, 1991. – 255 с.
2. Методы идентификации бактерий: учеб. пособ. / И.Н. Блохина [и др.]; под ред. И.Н. Блохиной. – Горький: Изд-во Горьков. гос. ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 1986. – 76 с.
3. Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями. Инструкция по применению: утв. Главным государственным санитарным врачом Респ. Беларусь 8.05.2009. – Минск: ГУ «Респ. центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», 2009. – 94 с.
4. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ министерства здравоохранения СССР, № 535. – М., 1985. – 126 с.
5. Особенности антибактериальной терапии в комплексном лечении гнойно-некротических поражений мягких тканей и гангрены нижних конечностей у больных сахарным диабетом / В.П. Булавкин [и др.] // Иммунология, аллергология и инфектология. – 1999. – №1. – С.114-119.
6. Покровский, В.И. Медицинская микробиология / В.И. Покровский, О.К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – 1200 с.
7. Руководство по инфекционным болезням / под ред. В.И.Покровского, К.М.Лобана. – М.: Медицина, 1996. – 464 с.
8. Тест-система «АБ – ГРАМ(-)» для оценки чувствительности грамотрицательных бактерий к антибиотикам / А.Н. Косинец [и др.] // Новости хирургии. – 2007. – Т. 15, № 3. – С. 57–64.
9. Хирургическое лечение больных с гнойными осложнениями диабетической стопы / В.П. Булавкин [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 1998. – №2. – С.46-47.
10. Шилин, В.Е. Автоматизированный комплекс для идентификации энтеробактерий / В.Е. Шилин // Вестн. ВГМУ. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 154–161.
11. Manual of Clinical Microbiology. – Fifth Edition / Ed. in Chief A. Balows. – Washington, D.C., 1991. – 1318 p.
12. Report of a Who Study Group Diabetes Mellitus. – Geneva, 1994.
13. The St. Vincent Declaration Newsletter. – 1995. Jes 7. – P. – 309 – 323.

Поступила 28.11.2011 г.

Принята в печать 02.12.2011 г.